

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : G01N 33/574	A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/43090 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Oktober 1998 (01.10.98)
--	----	---

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01627 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. März 1998 (20.03.98) (30) Prioritätsdaten: 197 11 932.8 21. März 1997 (21.03.97) DE (71)(72) Anmelder und Erfinder: WERENSKIOLD, Anne, Katrin [DE/DE]; Reulandstrasse 32, D-81377 München (DE). (74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).	(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>
--	---

(54) Title: *IN VITRO METHOD FOR PROGNOSIS OF THE ILLNESS EVOLUTION OF PATIENTS WITH CARCINOMA OF THE BREAST AND/OR FOR DIAGNOSING CARCINOMA OF THE BREAST*

(54) Bezeichnung: *IN VITRO-VERFAHREN ZUM PROGNOSTIZIEREN DES KRANKHEITSVERLAUFS VON PATIENTEN MIT MAMMAKARZINOM UND/ODER ZUM DIAGNOSTIZIEREN EINES MAMMAKARZINOMS*

(57) Abstract

Especially nodal conditions and tumour size, histological type, degree of differentiation and receptor condition are used nowadays for the prognosis and further planning of patients with carcinoma of the breast. Emphasis is placed on evaluation of the condition of the axillary lymph node. Patients with a negative axillary lymph node condition generally receive no after-treatment, as their prognosis is better; yet 30 % of these patients suffer relapses. The method proposed by this invention should make it possible to determine the patient's risk of recidivation. In accordance with the invention, the invention makes it possible to predict the further evolution of patients with carcinoma of the breast by means of a qualitative or quantitative determinatin of T1 protein and/or T1-mRNA in sample material taken from the patients.

(57) Zusammenfassung

Für die Prognose und weitere Therapieplanung von Mammakarzinompatienten werden heute in erster Linie der Nodalstatus sowie die Tumogröße, der histologische Typ, der Differenzierungsgrad und der Rezeptorstatus herangezogen, wobei der Schwerpunkt auf der Beurteilung des axillären Lymphknotenstatus liegt. Patienten mit negativem axillären Lymphknotenstatus werden, da sie eine bessere Prognose haben, in der Regel nicht nachbehandelt; 30 % dieser Patienten entwickeln jedoch Rezidive. Das Verfahren soll es ermöglichen, die Rezidivgefährdung von Patienten festzustellen. Das erfindungsgemäße Verfahren erlaubt durch die qualitative oder quantitative Bestimmung von T1-Protein und/oder T1-mRNA in aus dem Patienten gewonnenem Probenmaterial eine Vorhersage des weiteren Krankheitsverlaufs von Patienten mit Mammakarzinom.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		

In vitro-Verfahren zum Prognostizieren des Krankheitsverlaufs von Patienten mit Mammakarzinom und/oder zum Diagnostizieren eines Mammakarzinoms

Die vorliegende Erfindung betrifft ein in vitro-Verfahren zum Prognostizieren des Krankheitsverlaufs von Patienten mit Mammakarzinom und/oder zum Diagnostizieren eines Mammakarzinoms, Kits, die zum Durchführen dieses Verfahrens geeignet sind, sowie die Verwendung von T1-spezifischen Antikörpern oder Fragmenten davon oder von T1-spezifischen Oligonukleotiden zum Bestimmen von T1-Protein bzw. T1-mRNA in Patienten mit Mammakarzinom.

Mammakarzinome, insbesondere invasive Mammakarzinome, sind maligne Tumore mit extrem unterschiedlichem und bisher unvorhersagbarem klinischen Verlauf. Das invasive Mammakarzinom ist bei Frauen der am häufigsten auftretende maligne Tumor; an ihm erkrankt im statistischen Mittel jede 16. Frau. Bei bestehendem Mammakarzinom wird als primäre therapeutische Maßnahme zunächst der Mammatumor entfernt. Für die Prognose und weitere Therapieplanung gelten heute in erster Linie der Nodalstatus, aber auch die Tumogröße, der histologische Typ, der Differenzierungsgrad sowie der Hormonrezeptorstatus als wichtige Parameter. Der Schwerpunkt liegt aber auf der Beurteilung des axillären Lymphknotenstatus. So wird z.B. bei Patienten mit zum Zeitpunkt der Tumordiagnose bzw. Operation bereits bestehendem Lymphknotenbefall im Achselfeld (Nodal-positiv, N(+)) in der Regel sofort eine Chemotherapie durchgeführt, gegebenenfalls unterstützt von einer zusätzlichen Strahlentherapie. Patienten mit negativem axillären Lymphknotenstatus (Nodal-negativ, N(0)) haben generell eine bessere Prognose und werden deshalb in der Regel weder chemotherapeutisch noch strahlentherapeutisch nachbehandelt. Statistisch entwickeln jedoch bis zu 30 % der als N(0) eingestuften Patienten ein Rezidiv (Yuan 1992). Diese hohe Rezidivrate zeigt, daß die bisher bekannten Prognosefaktoren den Krankheitsverlauf nur sehr unvollständig beschreiben.

In den letzten Jahren wurde eine große Zahl von Molekülen im Hinblick auf ihre mögliche Verwendung als Prognosefaktoren für das Mammakarzinom untersucht (zur Übersicht: Schmitt et al., 1994; Hoskins and Weber, 1995), z.B. (Proto)Onkogene wie c-erbB-2 (Allred et al., 1992, Archer et al., 1995), das Tumorsuppressorgen p53 (Barnes et al., 1993, Lipponen et al., 1993), der Urokinase-Typ-Plasminogenaktivator uPA (Jaenicke et al., 1993; Wilhelm et al., 1994), das Adhäsionsmolekül E-Cadherin (Rasbridge et al., 1993; Graff et al., 1995) und das Zytoskelettprotein Vimentin (Sommers et al., 1992). Die Vimentinsynthese korreliert mit dem invasiven Wachstum von Mammakarzinom-Zelllinien in vitro (Thompson et al., 1991) und teilweise mit schnell wachsenden invasiven dukta- len Brustkarzinomen mit schlechter Prognose in vivo (Domagala et al., 1990). Mögliche Prognosefaktoren bilden weiterhin zytometrisch bestimmte morphome- trische und Texturmerkmale sowie DNS-Parameter (Auer et al., 1994).

Keiner der oben erwähnten Faktoren erlaubt jedoch eine ausreichend zuverläs- sige Prognose des weiteren Krankheitsverlaufs nach Mammakarzinomentfer- nung.

Aufgabe der Erfindung ist es daher, ein Verfahren bereitzustellen, das eine aus- reichend zuverlässige Prognose des weiteren Krankheitsverlaufs bei Mamma- karzinompatienten erlaubt.

Erfindungsgemäß wird diese Aufgabe durch ein in vitro-Verfahren zum Progno- stizieren des Krankheitsverlaufes von Patienten mit Mammakarzinom und/oder zum Diagnostizieren eines Mammakarzinoms gelöst, das das qualitative oder quantitative Bestimmen von T1-Protein und/oder T1-mRNA in aus dem Patienten gewonnenem Probenmaterial umfaßt.

Das T1-Protein ist ein extrazelluläres, lösliches Glykoprotein von 60-70 kDa (Werenskiold, 1992) mit Homologie zu Mitgliedern der Immunglobulin-Super- familie, insbesondere dem karzinomembryonalen Antigen (Klemenz et al., 1989).

Das Molekül wurde in einer Analyse früher Effekte von Onkoproteinen (p21^{ras} und p39^{v-mos}) auf die Genexpression in Fibroblasten identifiziert (Werenskiold et al., 1989). In der Maus erfolgt eine Synthese des T1-Proteins nur in embryonalen Geweben, sie ist im adulten Tier nicht nachweisbar (Rößler et al., 1995 a,b). Die Funktion des T1-Proteins ist noch nicht vollständig geklärt, doch gibt die Isolierung einer zweiten, membranständigen Variante des Moleküls (T1-M) Hinweise auf eine Funktion als Zytokinrezeptor. Das membranständige T1-M-Protein weist große Ähnlichkeit mit dem IL-1-Rezeptor Typ 1 auf, besitzt jedoch keine Affinität zu den Zytokinen IL-1 α und β (Rößler et al., 1995 b; Danescu and Werenskiold, 1995) oder IL-1ra (Gayle et al., 1996). T1-M stellt einen neuen Mastzell-spezifischen Zytokinrezeptor dar (Rößler et al., 1995 b; Thomassen et al., 1995). Die Onkogen-induzierbare lösliche Variante des T1-Proteins ist eine verkürzte Form dieses Rezeptors und entspricht dessen Liganden-bindender Domäne. Rekombinant hergestelltes, lösliches T1 aus der Maus (Rupp et al., 1995) blockiert das Wachstum von Mastzellen.

In Mammakarzinomen der Maus ist eine Überexpression des löslichen T1-Proteins bisher ausschließlich in invasiv wachsenden, schlecht differenzierten Tumoren beobachtet worden. Sowohl das Tumorstroma als auch die anaplastischen Tumorzellen synthetisieren T1. In situ-Hybridisierungen zeigen eine erhöhte Expression von T1 in Tumorzellen an der Peripherie von Tumorzellkomplexen und - möglicherweise von den Tumorzellen induziert - in den unmittelbar diesen benachbarten Stromazellen (Rößler et al., 1993). Die Induktion der T1-Expression in den Tumorzellen korreliert mit deren phänotypischer Transformation und wird von einem Verlust der E-Cadherin- und Zytokeratin-Produktion begleitet. Sie wird von einem AP1-abhängigen Promotor des T1-Gens gesteuert, der nur in nicht-hämopoetischen (z.B. fibroblastischen) Zellen aktiv ist (Thomassen et al., 1995). Während der phänotypischen Transformation der epithelialen Tumorzellen erfolgt die Induktion von T1 deutlich vor derjenigen des ebenfalls AP1-abhängigen, mesenchymalen Zytoskelettproteins Vimentin und bildet daher einen frühen Marker für den Transformationsprozeß.

Überraschenderweise hat sich nunmehr gezeigt, daß das Auftreten oder Fehlen einer T1-Transkription bzw. -Expression eine Aussage über den zukünftigen Krankheitsverlauf erlaubt, insbesondere Hinweise auf die Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Rezidivs oder der Entwicklung bzw. des Wachstums von Metastasen. Wie in den Beispielen ausführlich erläutert werden wird, korreliert in Patienten mit einem N(0)-Nodalstatus überraschenderweise ein hoher T1-Wert mit einer guten Prognose, während in Patienten mit N(+)-Nodalstatus ein hoher T1-Protein- bzw. T1-mRNA-Spiegel eine schlechte Prognose bedeutet.

In einer bevorzugten Ausführungsform wird das T1-Protein und/oder die T1-mRNA in einer Tumorgewebeprobe des Patienten bestimmt. Dazu werden z.B. Gewebeschnitte nach üblichen Verfahren angefertigt und fixiert und anschließend entweder einen Immuntest zum Nachweis vorhandenen T1-Proteines oder einer Hybridisierung mit markierten oder markierbaren Oligonukleotiden oder DNA-Fragmenten unterworfen. Wahlweise kann aus dem Tumorgewebe nach üblichen Verfahren Gesamt-RNA oder Poly(A)⁺-mRNA isoliert werden, die dann z.B. nach gelelektrophoretischer Auftrennung oder nach Fixierung an eine feste Matrix wiederum durch Hybridisieren mit einem markierten oder markierbaren Oligonukleotid bestimmt werden kann.

T1-Protein ist nicht nur im Tumorgewebe selbst nachweisbar, sondern auch in verschiedenen Körperflüssigkeiten betroffener Patienten. In einer bevorzugten Ausführungsform wird das erfindungsgemäße Verfahren mit einer Blut- oder Serumprobe durchgeführt.

Für die Bestimmung der T1-mRNA stehen eine Reihe von Verfahren zur Verfügung. Wie oben bereits angedeutet, ist es zum einen möglich, T1-mRNA in situ oder in entsprechenden RNA oder mRNA-Präparaten durch Hybridisieren mit einer entsprechenden Oligonukleotidsonde oder einem DNA-Fragment nachzuweisen. Die Oligonukleotidsonde bzw. das DNA-Fragment kann selbst ein meß-

bares Signal abgeben, z.B. radioaktiv markiert sein, oder durch Wechselwirkung mit anderen Molekülen zur Signalgebung fähig sein. Zur besseren Auswertung der entsprechenden Tests empfiehlt es sich in den meisten Fällen, eine Amplifikation des Signales herbeizuführen. Üblicherweise wird dazu die nachzuweisende Target-Nukleinsäure amplifiziert.

Für die Amplifizierung der Target-Sequenz, d.h. der T1-mRNA, mit dem PCR-Verfahren (Polymerase-Ketten-Reaktion) wird zunächst nach bekannten Verfahren eine cDNA-Kopie hergestellt. Diese cDNA-Kopie wird anschließend einer PCR unterworfen. Die Sequenz des menschlichen T1-Genes ist bereits teilweise bekannt (Tominaga et al., 1992), die Auswahl geeigneter Oligonukleotide zur Durchführung der reversen Transkription und des PCR-Verfahrens liegt daher im Bereich fachmännischen Könnens. Ein Beispiel eines geeigneten Oligonukleotides ist das Oligonukleotid mit der Sequenz 5'-CTT TGA TCA CCT GAA CTT TCT CTA GCA-3' oder ein Fragment davon. Ein weiterer geeigneter Primer ist der anti-sense-Primer 5'-AGT TTT CGG TTG TTG GTG CAT TTC-3' oder ein geeignetes Fragment davon. Bevorzugte Primer entstammen dem 3'-untranslatierten Bereich und/oder dem Bereich der Exons 8 und 9. Primer aus den genannten Bereichen haben den Vorteil, daß sie nur mit der für das tumorassoziierte T1-S-Protein kodierenden RNA hybridisieren, nicht jedoch mit der durch alternatives Spleissen entstandenen T1-M-mRNA. Einer der spezifischen Primer, sense- oder anti-sense-, kann gegebenenfalls durch einen kommerziell erhältlichen Random-Primer ersetzt werden. Im Stand der Technik sind inzwischen eine Reihe weiterer Verfahren bekannt, mit denen Target-Nukleinsäuren amplifiziert werden können. In diesem Zusammenhang wird z.B. verwiesen auf das Q-NASBA-Verfahren, bei dem die in der Probe vorliegende mRNA durch die konzertierte Aktion von reverser Transkriptase, RNase H und T7-Polymerase amplifiziert wird (Kievits et al., 1991). Eine weitere Möglichkeit ist der Nachweis von nach reverser Transkription erhaltenener DNA durch die sogenannte "Strand Displacement Amplification" (SDA) (Walker et al., 1996, sowie darin zitierte Literatur). Dem Fachmann sind noch eine Reihe weiterer Verfahren bekannt, die zum

Nachweis oder der Bestimmung der T1-mRNA ebenfalls herangezogen werden können.

Die gebildeten Amplifikations-Produkte werden auf dem Fachmann bekannte Weise nachgewiesen. So kann z.B. durch den Einbau Digoxigenin-haltiger Nukleotide und anschließende Umsetzung mit enzymkonjugierten anti-Digoxigenin-Antikörpern die mit dem PCR-Verfahren synthetisierte DNA sichtbar gemacht werden. Mit dem anti-Digoxigenin-Antikörper kann jedes zur Signalgebung fähige Enzym konjugiert werden, z.B. alkalische Phosphatase, saure Phosphatase, Peroxidase, β -D-Galaktosidase, Glucoseoxidase und Meerrettichperoxidase. In Abhängigkeit vom verwendeten Substrat kann die T1-mRNA quantitativ, z.B. durch Messung der Absorption oder der Fluoreszenz löslicher Produkte, oder zumindest qualitativ nachgewiesen werden.

Zum Beispiel eignet sich der von Boehringer Mannheim erhältliche, mit alkalischer Phosphatase konjugierte anti-Digoxigenin-Antikörper gut zum Bestimmen der vorhandenen T1-mRNA. Dem Fachmann ist bekannt, daß es noch weitere Möglichkeiten des Nachweises amplifizierter Nukleinsäuren, z.B. durch den Einbau biotinmarkierter Nukleotide und anschließende Umsetzung der Produkte mit Avidin- oder Streptavidin-konjugierten Enzymen, die eine Signalgebung ermöglichen, gibt. Ein solches Enzym kann schließlich auch an ein drittes Oligonukleotid gekoppelt sein, das einem Teilstück eines Strangs einer der amplifizierten Nukleinsäuren komplementär ist.

Die folgende Tabelle gibt Aufschluß über üblicherweise verwendete Enzyme und in Verbindung mit diesen Enzymen möglicherweise zu verwendende chromogene Substrate.

TABELLE 1

Enzyme	Chromogen
1. Alkalische Phosphatase und saure Phosphatase	4-Methylumbelliferylphosphat (*), Bis(4-Methylumbelliferylphosphat), (*) 3-O-Methylfluoreszein, Flavon-3-Diphosphatriammoniumsalz (*), p-Nitrophenylphosphatdinatriumsalz.
2. Peroxidase	Tyraminhydrochlorid (*), 3-(p-Hydroxyphenyl)-Propionsäure (*), p-Hydroxyphenethylalkohol (*), 2,2'-Azino-di-3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure (ABTS), ortho-Phenyldiamindihydrochlorid, o-Dianisidin, 5-Aminosalicylsäure, p-Ucresol (*), 3,3'-dimethoxybenzidin, 3-Methyl-2-benzothiazolinhydrazon, Tetramethylbenzidin
3. Meerrettichperoxidase	H_2O_2 + Diammoniumbenzidin K_2O_2 + Tetramethylbenzidin
4. β -D-Galaktosidase	o-Nitrophenyl- β -D-galaktopyranosid, 4-Methylumbelliferyl- β -D-galaktosid
5. Glukoseoxidase	ABTS, Glukose und Thiazolylblau

Anm: (*): fluoreszierendes Produkt

Der Nachweis der Amplifikations-Produkte kann nach Gelelektrophorese des Reaktionsgemisches im Gel erfolgen, er kann aber auch in Lösung oder nach Bindung an eine feste Matrix erfolgen. Auf dem Markt ist derzeit eine Vielzahl von Systemen erhältlich, die dem Nachweis von amplifizierter DNA dienen und auf die Bedürfnisse des Nachweises von T1-mRNA zugeschnitten werden können.

Während die oben erwähnten Verfahren die reverse Transkription und/oder Amplifikation der nachzuweisenden Nukleinsäure, im vorliegenden Fall der T1-

mRNA involvieren und dadurch einen Nachweis auch geringster Mengen T1-mRNA ermöglichen, beruhen andere Verfahren auf dem Nachweis der Moleküle durch Amplifikation des Signals. Ein Beispiel dafür ist bDNA-Verfahren (Pachl et al., 1994), bei dem die nachzuweisende Nukleinsäure über Hybridisierung mit einem Oligonukleotid an eine feste Matrix gekoppelt wird, über eine weitere Hybridisierung mit einem zweiten Oligonukleotid an eine verzweigte DNA, die wiederum mit einer Vielzahl von mit einem signalgebenden Enzym gekoppelten Oligonukleotiden hybridisiert. Durch die Verzweigung der DNA ist das Anheften einer großen Menge signalgebender Enzymeinheiten pro vorhandenem Targetmolekül möglich.

In einer weiteren Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens wird das Probenmaterial einem für T1 spezifischen Antikörper oder Fragmenten eines solchen ausgesetzt. Geeignete Antikörperfragmente sind z.B. Fab- und F(ab)₂-Fragmente. Die Antikörper oder Antikörperfragmente können beispielsweise direkt mit dem Gewebeschnitt inkubiert werden oder aber einem Immuntest ausgesetzt werden, bei dem Proteinextrakt z.B. an Mikrotiterplatten fixiert wird, auf einer Gelmatrix aufgetrennt oder auf andere Weise dem Antikörper zugänglich gemacht und mit diesem in Kontakt gebracht wird. Bei den Antikörpern kann es sich um monoklonale oder polyklonale Antikörper handeln, es können z.B. Maus-, Kaninchen- oder Ratten-Antikörper sein. Die Antikörper sollten spezifisch mit dem T1-Protein bzw. ausgewählten Epitopen dieses Proteins reagieren. In einer Ausführungsform wird das Verfahren mit Antikörpern durchgeführt, die für das p9-Peptid oder das p16-Peptid aus Maus-T1 (Werenskiold, 1992) spezifisch sind. Das p9-Peptid stammt aus einem Bereich, der eine vollständige Immunglobulin-ähnliche Halbdomäne des Proteins überspannt. Das p16-Peptid entspricht dem carboxyterminalen Teil des Proteins und enthält keine mit dem IgC2-Motiv der Immunglobulinsuperfamilie verwandte Sequenz. Die Antikörper können gegen das p9- oder p16-Peptid aus der Maus oder korrespondierenden Peptiden anderer Säugetiere gerichtet sein, solange sie mit dem entsprechenden T1-Protein menschlicher Herkunft kreuzreagieren.

In einer bevorzugten Ausführungsform sind die Antikörper gegen antigene Determinanten des menschlichen, löslichen T1-Protein gerichtet. Zur Minimierung der Gefahr einer Kreuzreaktion mit vollständigem Membran-gebundenen Rezeptor empfiehlt es sich, ein Peptid zu wählen, das im T1-Rezeptor nicht vorhanden ist. In einer bevorzugten Ausführungsform ist der Antikörper gegen ein Peptid gerichtet, das die Sequenz p-SKEC umfaßt. Der für dieses Peptid kodierende Bereich liegt zwischen den Exons 8 und 9 und wird nur für das lösliche Protein (T1-S), nicht aber für den Rezeptor (T1-M) exprimiert.

Erfindungsgemäß wird weiter ein Kit zur Verfügung gestellt, der zum Durchführen des erfindungsgemäßen Verfahrens geeignet ist. Der Kit enthält T1-spezifische Antikörper oder Fragmente davon sowie gegebenenfalls Mittel, den Antikörper oder seine Fragmente nachzuweisen. Bei diesen Mitteln kann es sich beispielsweise um enzymkonjugierte anti-Ig-Antikörper handeln, die spezifisch an die jeweils verwendeten anti-T1-Antikörper binden. Der Nachweis dieser Antikörper kann mit üblichen Methoden, die bereits oben diskutiert worden sind, erfolgen. Die dafür erforderlichen Mittel, z.B. Enzymsubstrat, können im Kit ebenfalls zur Verfügung gestellt werden. Der Kit kann weiterhin so aufgebaut sein, daß die zum Nachweis geeigneten Antikörper bzw. Antikörperfragmente an eine feste Phase gekoppelt vorliegen. Die feste Phase kann z.B. die Form von Mikropartikeln, z.B. Glas-, Polyacrylamid- oder Sephadexkugeln haben, oder aus Mikrotiterplatten bestehen. Andere Möglichkeiten der Fixierung der Antikörper an eine feste Matrix sind ebenfalls eingeschlossen.

Bei dem im erfindungsgemäßen Kit vorgesehenen Antikörper bzw. Fragmenten davon kann es sich um einen monoklonalen oder polyklonalen Antikörper handeln. Dieser wird auf dem Fachmann bekannte Weise durch Immunisieren mit dem jeweils gewünschten Antigen, z.B. dem p9- oder p16-Peptid, hergestellt. Ausreichende Mengen dieser Peptide können durch rekombinante Expression in eukaryontischen Systemen, z.B. im Vacciniavirussystem (Werenskiold, 1992),

oder in prokaryontischen Wirten, z.B. in E. coli, B. subtilis oder Streptomyzeten, zur Verfügung gestellt werden. In einer weiteren Ausführungsform werden statt natürlicher oder rekombinant exprimierter Proteine synthetisch hergestellte Peptide zum Immunisieren verwendet. Besonders bevorzugt sind dabei Peptide, die die Sequenz p-SEKC umfassen.

In einer weiteren Ausführungsform wird ein Kit zur Verfügung gestellt, der zum Nachweis von T1-spezifischen Nukleinsäuren, bevorzugt T1-spezifischer mRNA geeignet ist. Der Kit enthält mindestens ein Oligonukleotid, das zur T1-mRNA komplementär ist, daher mit dieser hybridisieren kann und gegebenenfalls als Primer für die reverse Transkription und/oder die Polymerasekettenreaktion dienen kann. Kits, die letztlich der Durchführung einer PCR dienen sollen, können weiterhin ein oder mehrere weitere Oligonukleotide enthalten, die dem sense-Strang der T1-mRNA entsprechen und in Kombination mit dem ersten Oligonukleotid die Amplifikation der T1-mRNA erlauben.

Ein erfindungsgemäßer Kit zum Nachweis der T1-mRNA kann darüber hinaus die zur reversen Transkription und/oder zur Amplifikation notwendigen Enzyme, z.B. reverse Transkriptase, DNA-Polymerase, RNase H, T7-Polymerase und/oder Mittel zum Nachweis der amplifizierten Produkte enthalten. Die Amplifikations-Produkte können beispielsweise durch eingebaute modifizierte Nukleotide nachgewiesen werden, z.B. digoxigenierte oder biotinylierte Nukleotide, oder aber durch Hybridisierung eines markierten oder markierbaren Oligonukleotids, das zur T1-mRNA oder ihrem komplementären Strang komplementär ist, nachgewiesen werden. Eine weitere Möglichkeit des Nachweises liegt in der Verwendung modifizierter Primer, die beispielsweise an ihrem 5'-Ende mit einem Antigen verbunden sind, das von einem enzymgebundenen Antikörper erkannt wird. In der Literatur finden sich ungezählte Beispiele solcher Nachweisverfahren, die dem Fachmann vertraut sind und die Ausgestaltung des Kits im einzelnen bestimmen.

Wie bereits erwähnt, ist die Nukleotidsequenz des T1-Genes und damit der kodierenden Bereiche der T1-mRNA bekannt. In Kenntnis der Sequenz kann der Fachmann ohne weiteres geeignete Primer aussuchen. Bevorzugte Ausführungsformen sehen die Verwendung eines Oligonukleotids mit der Sequenz 5'-CTT TGA TCA CCT GAA CTT TCT CTA GCA-3' als erstem Oligonukleotid und die eines Oligonukleotids mit der Sequenz 5'-AGT TTT CGG TTG TTG GTG CAT TTC-3' als weiterem Oligonukleotid vor. In bevorzugten Ausführungsformen ist mindestens eines der Oligonukleotide an seinem 5'-Ende mit einem Antigen oder einem zur Signalgebung fähigen Enzym konjugiert.

Die Erfindung betrifft weiterhin die Verwendung von T1-spezifischen Antikörpern oder Fragmenten solcher Antikörper zum Nachweisen der Gegenwart von T1-Protein in Gewebeproben, Blut- oder Serumproben eines Patienten mit Mammakarzinom. Der Nachweis des T1-Proteines kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erfolgen. Die Erfindung betrifft auch die Verwendung von T1-spezifischen Oligonukleotiden zum Nachweisen von T1-mRNA in Probenmaterial aus Patienten mit Mammakarzinom. Bei dem verwendeten Oligonukleotid kann es sich um sense- oder anti-sense-Oligonukleotide handeln.

Die Abbildungen und die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beschreibung der Abbildungen

Abbildung 1: Nachweis humaner T1-mRNA-Spezies in kultivierten Zellen und in Primärgewebe. Gesamt-RNA (10 μ g, Spuren 1, 3, 5) oder Poly(A)⁺-RNA (1 μ g, Spuren 2, 4) aus etablierten Keratinozyten der Haut (Ha-Cat, Spuren 1, 2) und Mastzellen (HMC-1, Spuren 3, 4) sowie aus reifer Plazenta (5) wurden mit einem 1%igen Agarosegel fraktioniert, auf eine Nylonmembran transferiert und mit T1-spezifischen Proben hybridisiert.

A: Hybridisierungsprobe aus dem ORF (Positionen 45-602 der cDNA-Sequenz nach Tominaga, 1992); detektiert werden 3 mRNA-Spezies mit Größen von 5 kb, 2,7 kb und 2 kb.

B: Hybridisierungsprobe aus dem 3'-untranslatierten Bereich (Position 990-1310 der cDNA-Sequenz nach Tominaga, 1992); detektiert spezifisch die 2,7 kb-T1-mRNA (sowie unspezifisch 28 S rRNA in Gesamt-RNA-Proben). Die Position der ribosomalen RNA (28 S und 18 S) ist links angegeben.

C: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis der 2,7 kb-T1-mRNA. T1-positive Gesamt-RNA aus Plazenta wurde in T1-negativer Gesamt-RNA der Zelllinie U2OS seriell verdünnt und die RNA-Gemische wurden revers transkribiert. Aliquots der cDNA, die jeweils 25 ng RNA-Gemisch/Test entsprechen, wurden mittels PCR analysiert (siehe Material und Methoden: 25 ng für T1-PCR, 1 µl daraus für Aktin-PCR). Die Menge von Plazenta-RNA (in ng) pro 25 ng Gesamt-RNA ist über den Spuren angegeben. (Null: Reaktion nur mit T1-negativer RNA; Minus: Negativkontrolle, d.h. PCR ohne cDNA-Matrize). Je 10 µl der Reaktionsprodukte wurden in einem 2% TBE (Trisborat/EDTA-Puffer) Gel aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt.

Abbildung 2: Semiquantitative RT-PCR zum Nachweis von 2,7 kb T1-mRNA in Gesamt-RNA aus Mammakarzinomen. Durchführung siehe Material und Methoden. Es wurden je 10 µl der Reaktionsprodukte auf Agarosegelen aufgetrennt und Ethidiumbromid angefärbt.

Quantitative Auswertung: Densitometrische Bestimmung der Etidiumbromidintensität der spezifischen Amplifikate der Aktin- und T1-mRNA. Die beobachtete T1-mRNA-Expression wurde wie folgt bewertet:

Signalstärke T1: Aktin < 0,1:	T1-negativ, Klasse I
Signalstärke T1: Aktin = 0,1 bis 1:	T1-positiv, Klasse II
Signalstärke T1: Aktin > 1:	T1-positiv, Klasse III

Abbildung 3: Metastasierung in Nodal-negativen Patientinnen. Die Wahrscheinlichkeit für ein rezidivfreies Überleben wurde für das Kollektiv von 16 Nodal-negativen Patientinnen aus Beispiel 4 ermittelt. Aufgetragen ist die Anzahl überlebender Patientinnen in Abhängigkeit von der Zeit und unterteilt nach Patientinnen, deren Mammakarzinom-Zellen T1-negativ ($n = 8$, 0 Rezidive) bzw. T1-positiv ($n = 8$, 5 Rezidive) waren.

Abbildung 4: Nachweis von T1-Protein in Mammakarzinomen. Die Immunfärbung wurde wie in Beispiel 5 angegeben durchgeführt.

A) Duktales Karzinom; B) Duktolobuläres Karzinom.

T1-spezifische Signale (dunkle Färbung) können nur in Tumorzellen, nicht aber in umgebenden Stroma beobachtet werden.

Abbildung 5: Prognostische Bedeutung des T1-S-RNA-Spiegels für den Krankheitsverlauf von Patientinnen mit Nodal-negativem Mammakarzinom. Der T1-RNA-Spiegel wurde für ein Kollektiv von 55 Fällen ermittelt (Beispiele 6, 10). Aufgetragen ist die Wahrscheinlichkeit für ein rezidivfreies Überleben in einem Nachbeobachtungszeitraum von 5 Jahren. Der Krankheitsverlauf von Patientinnen, deren Mammakarzinom einen niedrigen T1-RNA-Spiegel ($n = 21$, 7 Rezidive) bzw. einen hohen T1-RNA-Spiegel ($n = 34$, 3 Rezidive) zeigte, wurde getrennt aufgetragen.

Beispiele

Material und Methoden

1. RNA-Präparation

1.1 Für die Isolierung von Gesamt-RNA aus tiefgefrorenem Tumorgewebe wurde das Gewebe zunächst unter flüssigem Stickstoff in einem RNase-

freien Mörser pulverisiert. Zu je 100 mg pulverisierten Gemisches wurde 1 ml Gua SCN-Lösung (4 M Guanidiniumisothiocyanat, 25 mM Natriumcitrat pH 7,0, 0,5 % Natriumlauroysarcosinat, 0,1 M β -Mercaptoethanol) pipettiert. Die Suspension wurde in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß (ERG) überführt. Zu dieser Suspension wurden nacheinander 90 μ l 2 M NaAcetat pH 4,0 (1/10 Vol.), 900 μ l wäßriges Phenol und 180 μ l Chloroform/Isoamylalkohol (49:1; v:v) zupipettiert, wobei nach jedem Schritt sorgfältig gemischt wurde. Anschließend wurde 15 min auf Eis und 10 min bei RT inkubiert und danach 10 min mit 10000 x g zentrifugiert.

Die wäßrige Phase wurde vorsichtig abgehoben und in ein neues ERG transferiert. Die RNA wurde mit 900 μ l Isopropanol (1 Vol.) bei -20°C gefällt (> 1 Std.).

Reinigung:

Sobald die RNA gefällt vorlag, wurde auf RNase-freies Arbeiten geachtet (RNA-Lösung wurde stets auf Eis gekühlt, es wurde nur frisch autoklaviertes Wasser verwendet; das Tragen von Handschuhen war obligatorisch).

Zur Reinigung der RNA wurde eine zusätzliche Ethanolfällung durchgeführt: Die Isopropanol-gefällte RNA wurde abzentrifugiert (4°C; 10000 g; 10 min) und mit 70 %igem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde in 300 μ l H₂Obidest vollständig gelöst und danach mit 1/10 Vol. Na-Acetat (s.o.) und 900 μ l (3 Vol.) eiskaltem Ethanol_(absolut) versetzt. Die RNA wurde erneut bei -20°C über Nacht gefällt. Nach Zentrifugation bei 4°C (20 min; 10000 x g) wurde das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20-50 μ l H₂Obidest aufgenommen. Die RNA wurde entweder bei -70°C oder in Ethanol bei -20°C aufbewahrt.

- 1.2 Poly(A)⁺-RNA wurde unter Verwendung von Poly(A)-Quicksäulen (Stratagene, Heidelberg, DE) angereichert oder durch Chromatographie auf Oli-

go(dT)-Zellulose isoliert, wie beschrieben in Maniatis, T., et al., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor, N.Y.

2. Northern Blots

Zum Durchführen von Northern Blots wurden zunächst 5 µg RNA glyoxyliert und auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt, (McMaster et al., 1977). Die Gele wurden vor dem Transfer auf Biodyne-Membranen (Pall Ultrafine Filtration Co., Glen Cove N.Y.) mit Akridinorange gefärbt. Die RNA wurde anschließend durch einstündiges Backen bei 80°C an der Membran fixiert.

RNA-Blots wurden mindestens 3 Stunden in Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 10 mM Tris-Hydrochlorid pH 7,5, 2 x SSC (20 x SSC: 3 M NaCl + 0,3 M Natriumcitrat), 5 x Denhardt's Lösung (50 x Denhardt's Lösung: 1% Ficoll, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% Rinderserumalbumin), 1% Natriumdodecylsulfat und 0,1 mg denaturierte DNA pro ml) vorinkubiert. Anschließend wurden sie in frischem Puffer, enthaltend $0,5 \times 10^6$ bis 2×10^6 cpm radiomarkierter Sonde pro ml 15 Stunden bis 3 Tage bei 45°C in einem rollenden Ofen (Bachhofer) hybridisiert. Die Filter wurden gründlich in 0,1 x SSC, 0,1% SDS bei 65°C gewaschen und autoradiographiert.

3. PCR-Reaktion

3.1 Qualitative PCR

Für die Durchführung der PCR-Reaktion wurde 1 µg Gesamt-RNA 5 Minuten bei 95°C denaturiert, in 20 µl RT-PCR-Puffer (50 mM KCl, 20 mM Tris, 2,5 mM MgCl₂, 0,1 mg/ml Rinderserumalbumin, jeweils 1 mM dATP, dCTP, dGTP und TTP pH 8,4, 0,5 Einheiten RNasin, 0,09 OD₂₆₀-Einheiten Random-Primer (BRL, Eggenstein, DE) aufgenommen und mit 200 Einheiten Moloney-Maus-Leukämievirus (MMLV) Reverser Transkriptase (BRL) versetzt. Die Reaktionsansätze wurden 10 Minuten bei 20°C und anschließend 45 Minuten bei 42°C inkubiert und die Reaktion dann durch 5 Minuten Erwärmen

auf 95°C beendet. Für die Amplifikation wurden die cyclischen Reaktionen in einem Thermalcycler (TC1, Perkin Elmer, Überlingen, DE) durchgeführt. Jeder Zyklus bestand aus 1 Minute Denaturieren bei 94°C, 1 Minute Hybridisieren bei 55°C und 3 Minuten Polymerisation bei 72°C. Es wurden 30 Amplifikationszyklen durchgeführt. Im letzten Zyklus wurde die Polymerisation um 10 Minuten verlängert.

In jedem Amplifikationstest wurde ein 10 µl Aliquot des Reversen-Transkriptionscocktails verwendet. Die Aliquots wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl in RT-PCR-Puffer inkubiert, der 10 pmol jedes der beiden spezifischen Primer, und 1 Einheit DNA-Polymerase (AmpliTaq, Perkin Elmer) enthielt. Nach Vervollständigung der Reaktion wurden die Proben mit Chloroform extrahiert und die Reaktionsprodukte nach Auftrennung der Aliquots der Reaktion auf 2%igen Agarosegelen beobachtet.

3.2 Semiquantitative PCR (für Beispiele 1 und 2)

Für die semiquantitative PCR-Analyse werden parallele Ansätze mit verschiedenen cDNA-Verdünnungen (entsprechend 500 ng/125 ng/31 ng Gesamt-RNA) für die T1-PCR-Reaktion (50 µl) eingesetzt. Aus dem fertig pipettierten, aber noch nicht amplifizierten Reaktionsgemisch werden 2 µl entnommen und in einem separaten 50 µl Ansatz zusammen mit 10 pm Aktin-primer unter den gleichen Bedingungen, wie für die qualitative PCR beschrieben, amplifiziert. Die für die Amplifikationsreaktion verwendeten Primer flankierten ein 322 bp-Fragment des T1-S3'NTR (T13'seq und T13'rev) oder ein 650 bp-Fragment der für humanes Aktin kodierenden Sequenz (Acseq und Acrev). Die Primer hatten die folgenden Sequenzen:

T13'seq: CTTTGATCACCTGAACTTCTCTAGCA

T13'rev: AGTTTTCGGTTGGTGCATTTC

Acseq: GGTCAACCCACACTGTGCCCATCTA

Acrev: GCATTGCGGTGGACGATGGAGGG

Für die Auswertung werden gleiche Mengen der amplifizierten T1-Ansätze und der Aktinreaktionen auf 2 %igen Agarosegelen elektrophoretisiert. Das Verhältnis der Bandenstärken der T1- bzw. Aktin-spezifischen Banden wird densitometrisch bestimmt.

3.3 Semiquantitative RT-PCR (für Beispiel 6)

Die reverse Transkription und die PCR-Analyse wurden im wesentlichen durchgeführt, wie in 3.2 beschrieben, jedoch wurde ein PTC100 Thermocycler (Biozym, Oberdorf, FRG) verwendet. Die Ansätze wurden 30 Amplifikationszyklen unterworfen, wobei jeder Zyklus 30 Sekunden bei 92°C, 1 Minute bei 55°C und 1 Minute bei 72°C umfaßte.

Es wurden die in 3.2 beschriebenen Primer verwendet. Für die semiquantitative Analyse wurden reverse Transkripte von 25 bis 250 ng RNA als Matrize für die PCR-Amplifikation von T1-S in einem Endvolumen von 25 µl verwendet. 1 µl der vollständig zusammenpipettierten T1-PCR-Ansätze diente als Matrize für die Amplifikation von Aktin in einem separaten Röhrchen in einem Endvolumen von 25 µl. Die entsprechende T1-S- und aktinspezifische PCR-Reaktionen wurden gleichzeitig amplifiziert. 10 µl der Reaktionsprodukte wurden gemischt und in 1,5%igen Agarosegelen (70 min, 4 V-CM) aufgetrennt. Die Gele wurden mit Ethidiumbromid angefärbt und die Ethidiumbromidfluoreszenz unter Verwendung eines Gelprint 2000 i Videodokumentationssystems (MWG Biotech, Ebersberg, FRG) aufgezeichnet. Die Signalintensität wurde unter Verwendung der integrierten 1 D Scan Software quantifiziert. Die T1-S-mRNA-Expressionsspiegel wurden nach Normalisierung der T1-S-spezifischen Signale anhand der aktinspezifischen Signale der entsprechenden PCR-Reaktion berechnet. Proben ohne Zusatz einer RNA-Matrize in allen reversen Transkriptionsreaktionen und PCR An-sätzen wurden als negative Kontrolle eingesetzt. Plazenta-RNA wurde als ein externer Standard für die reverse Transkription und PCR-Amplifikation verwen-

det und führte zu einem T1-RNA-Spiegel von $1,8 \pm 0,1$. In jedem PCR-Lauf wurden Verdünnungsreihen der cDNA analysiert. Die aus verschiedenen Verdünnungen berechneten T1-Spiegel unterschieden sich normalerweise um weniger als 10%. Die mittleren T1-Spiegel für die individuellen Tumor-RNA-Proben wurden aus mindestens 2 unabhängigen PCR-Läufen (mit mindestens 2 Verdünnungen der cDNA) für jede der beiden unabhängigen reversen Transkriptionsreaktionen berechnet. Die quantitative Auflösung des Verfahrens wird hier in einem Verdünnungsexperiment demonstriert: T1-positive Plazenta-RNA wurde in einer Verdünnungsreihe im Verhältnis von 1:3 mit T1-negativen RNA aus BeWo-Chorionkarzinomzellen verdünnt. 25 ng jeder RNA-Mischung wurden als Matrize für RT-PCR verwendet. Die Ansätze, die eine abnehmende Menge von Plazenta-RNA enthielten (25 bis 0,8 ng), führten zu abnehmenden Mengen des T1-spezifischen Amplifikationsproduktes in Gegenwart einer konstanten Menge aktinspezifischer Produkte in allen Reaktionen. Das Auftragen des T1-mRNA-Spiegels gegen die Menge T1-positiver Plazenta-RNA-Matrize in jeder Reaktion zeigt eine lineare Korrelation über einen Bereich von 0,8 bis 8,3 ng Matrize. In Gegenwart von 25 ng Plazenta-RNA im RT-PCR-Test überstieg die T1-Amplifikation den linearen Bereich des Testes.

4. In situ-Hybridisierung

4.1 Immunhistochemische Methode für Beispiel 2

Gefrierschnitte gefrorenen Tumorgewebes von 7 bis 9 μm Dicke wurden bei -20°C geschnitten, auf Silan-beschichtete Objektträger übertragen und in 4% Paraformaldehyd (PAF) in phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 1,4 mM Kaliumdihydrogenphosphat, pH 7,3) 30 Minuten fixiert. Fixierte Schnitte wurden bei 43°C getrocknet. Vor der Hybridisierung wurden die Schnitte 5 Minuten bei Raumtemperatur in PBS rehydriert, mit Proteinase K (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in 100 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8) 5 bis 10 Minuten bei 37°C behandelt und 5 Minuten

in 4% PAF in PBS bei Raumtemperatur refixiert. Anschließend wurden die Proben 3 x 3 Minuten in PBS gewaschen und 10 Minuten unter tropfenweisem Zusatz von 0,25% Essigsäureanhydrid in 100 mM Triäthanolamin inkubiert. Die Schnitte wurden mindestens 1 Stunde bei 37°C in 50% Formamid, 2 x SSC (0,3 M NaCl, 30 mM Natriumcitrat, pH 7) vorhybridisiert. Anschließend wurden jedem Gefrierschnitt 20 µl Hybridisierungspuffer (50% Formamid, 2 x SSC, 10% Dextransulfat, 0,1% SDS, 250 µg/ml denaturierte Lachsperma-DNA, pH 7), enthaltend 1×10^6 cpm ^{35}S -markierte RNA-Sonde, zugefügt und die Hybridisierung 16 bis 18 Stunden bei 42°C in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Schnitte wurden 3 x für 20 Minuten in 4 x SSC bei 42°C gewaschen, mit RNase A (20 µg/ml in 0,5 M NaCl, 10 mM Tris, 5 mM EDTA, pH 8) 30 Minuten bei 37°C behandelt, 1 x mit 2 x SSC und 1 x mit 1 x SSC 30 Minuten bei 42°C gewaschen, in Ethanol dehydriert und luftgetrocknet. Die trockenen Objekträger wurden in Kodak NTB-2 Fotoemulsion (Tecnomara, Fernwald) getaucht, 1 bis 3 Wochen exponiert, dann entwickelt (Kodak D19) und fixiert (Unifix, Kodak). Schließlich wurden die Schnitte mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt, dehydriert, in Eukitt (Kindler, Freiburg, DE) eingebettet und unter Verwendung eines Zeiss Axioskops mit Hell- und Dunkelfeldeinrichtung angesehen.

4.2 Immunhistochemische Methode für Beispiele 7 und 8

Das polyklonale Serum, das gegen ein synthetisches Peptid erzeugt worden ist, das der C-terminalen Sequenz von Maus-T1-S entspricht, ist bereits beschrieben worden (Rössler, 1995b). Gereinigtes IgG wurde bei einer Konzentration von 7 µg/ml verwendet. Der monoklonale Antikörper M144 wurde in Ratten gegen rekombinantes humanes T1-S-Fc aus COS-Zellen erzeugt, die Arbeitskonzentration betrug 16 µg/ml. Die immunhistochemischen Untersuchungen wurden an formalinfixierten, in Paraffin eingebetteten Schnitten unter Verwendung des ABC-Vektorperoxidase-Färbungskits (Camon, Wiesbaden, FRG) durchgeführt. Die Spezifität der T1-Färbung wurde durch Prä-

adsorption mit einem 25-fachen molaren Überschuß gereinigten Antigens vor der Immunfärbung unter Verwendung von irrelevanten Kontrollantikörpern bestätigt. In diesen Reaktionen wurden keine Signale erhalten. Außerdem reagierten beide T1-spezifischen Antiseren mit T1-mRNA-positiven, aber nicht mit T1-mRNA-negativen kultivierten Zellen unter den Versuchsbedingungen, die für die Anfärbung der Tumorschnitte verwendet worden sind.

Die immunhistochemische T1-Reaktivität wurde mittels einer Modifikation des in Remmele und Stegler, 1987, beschriebenen Verfahrens unter Verwendung von zwei Multiplikatoren bestimmt: Die T1-Färbungsintensität wurde als nicht vorhanden (0), niedrig (1), mittel (2) oder hoch (3) klassifiziert. Die Klassifizierung des Prozentsatzes T1-reaktiver Tumorzellen wurde mit den folgenden Cut-off-Grenzen durchgeführt: $\geq 80\%$ (4), $\geq 50\%$ (3), $\geq 20\%$ (2), $\leq 20\%$ (1), 0% (0). Der T1-Proteinspiegel wurde als Produkt beider Variablen erhalten und überspannte einen Bereich von 0 bis 12.

5. Statistische Methoden

Univariate Analysen wurden mittels Fisher's T-Test bzw. Chi-Quadrat-Test durchgeführt.

Beispiel 1

Expression von T1-mRNA in Humanzellen und -gewebe

Die T1-mRNA-Expression wurde in Gesamt-RNA und Poly(A)⁺-angereicherter RNA analysiert, die aus kontinuierlichen Keratinozyten (Ha-Cat) und reifer Plazenta isoliert worden waren. Die Northern Blot-Hybridisierung mit Sonden, die den 5'-Teil des offenen Leserasters der T1-cDNA enthalten, zeigte 3 Transkripte von 2 kb, 2,7 kb und 5 kb (Abbildung 1A). Die Größe der letztgenannten 2 Transkripte stimmt gut mit Ergebnissen überein, die in Mäusezellen erhalten

worden sind, in denen eine T1-mRNA von 5 kb den Transmembranrezeptor T1-M und eine T1-mRNA von 2,7 kb das tumorassoziierte lösliche T1-Protein kodiert. Die Hybridisierung mit einem Fragment des 3'-nicht-translatierten Bereiches (Positionen 45-602 der cDNA-Sequenz nach Tominaga, 1992) der humanen T1-cDNA bestätigte die Identität der humanen 2,7 kb mRNA mit der das ausgeschiedene T1-Protein kodierenden Spezies (Abbildung 1B).

Für einen empfindlicheren Nachweis von T1-mRNA in Tumoren wurde ein semi-quantitativer RT-PCR-Test etabliert. Für die ausgeschiedene tumorassoziierte T1-Variante spezifische PCR-Primer wurden so ausgewählt, daß sie zur Erzeugung eines 322 bp-Fragmentes im 3'-nicht-translatierten Bereich führten. Als interne Kontrolle wurden Aktinsequenzen koamplifiziert. Nach RT-PCR von RNA-Präparationen, die sich in Northern-Blot-Hybridisierungen als positiv erwiesen hatten, wurden Amplifikationsprodukte der erwarteten Größe erhalten. Die quantitative Auflösung des Verfahren wurde in einem Verdünnungsexperiment demonstriert. Es wurde eine Verdünnungsreihe von T1-positiver Plazenta-RNA in T1-negativer RNA gleicher Konzentration angelegt und mittel RT-PCR analysiert. Wie in Abbildung 1C gezeigt ist, wurde eine lineare Abnahme des T1-spezifischen Amplifikationsproduktes in Reaktionen beobachtet, die 25 bis 1,5 ng Plazenta-RNA enthielten. Aufgrund der Gegenwart ansteigender Mengen T1-negativer RNA in diesem Test wurden konstante Mengen Aktin-spezifischer Produkte in allen Reaktionen erhalten.

Beispiel 2

T1-mRNA-Expression in Mammakarzinomen

Es wurde die Gesamt-RNA aus frisch eingefrorenem Gewebe von 41 Patienten mit invasivem Mammakarzinom und 6 Patienten mit Mastopathie isoliert; als positives Kontrollgewebe wurde Plazenta verwendet. Die Expression der 2,7 kb T1-mRNA wurde mittels des oben beschriebenen semiquantitativen RT-PCR untersucht.

Für die quantitative Bewertung der T1-Expression wurden die coamplifizierten Aktinsequenzen aus der gleichen Probe als interner Standard verwendet (siehe Abb. 2).

In allen 6 Proben von Mastopathiepatienten wurde keine T1-mRNA oder nur vernachlässigbar geringe Mengen nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigten die T1-mRNA-Spiegel in aus Tumorgewebe gewonnener RNA eine hohe Variabilität. Die quantitative Auswertung erfolgte densitometrisch (siehe Legende zu Abb. 2). Für die weitere Analyse wurde ein Klassifikationsschema mit 3 Kategorien verwendet. Die T1-mRNA-Spiegel wurden wie folgt bewertet:

- (I): T1-negativ: T1-Amplifikationsprodukt nicht nachweisbar oder nur sehr schwach sichtbar (T1: Aktin < 0,1);
- (II): T1-positiv: mittlere T1-mRNA-Werte, eindeutig nachweisbar, aber schwächer als das Aktinsignal (T1: Aktin = 0,1 bis 1);
- (III): T1-positiv: hohe T1-mRNA-Werte, Signal gleich stark oder stärker als das Aktinsignal (T1: Aktin > 1).

Beispiele für das Bewertungsmuster sind in Abbildung 2 gezeigt. Bei Anwendung dieses Schemas umfaßte die Klasse I alle 6 Mastopathie-Proben und 34% der Tumore (N = 13). 49% der Tumore (N = 21) wurden als II bewertet und 17% der Tumore (N = 7) zeigten hohe T1-mRNA-Spiegel (III) (siehe Tabelle 2).

Beispiel 3

Korrelation der T1-Expression mit bekannten Prognosekriterien

3.1 T1-Expression und histologischer Typ

Bei den 40 untersuchten Karzinomen handelte es sich um 12 lobuläre Karzinome, 7 duktolobuläre und 21 duktale Karzinome. Bei diesen Tumoren wurde folgende T1-Expression festgestellt:

TABELLE 2

histologischer Typ	T1-mRNA-Spiegel		
	I	II	III
lobulär (12)	5 (42%)	5 (42%)	2 (16%)
duktolobulär (7)	1 (14%)	6 (86%)	-
duktal (21)	6 (28%)	10 (48%)	5 (24%)

3.2 T1-Expression und Tumorgrading

Die T1-Expression zeigte keine Korrelation mit dem Tumorgrading.

3.3 T1-Expression und Tumorgröße

T1-Expression und Tumorgröße korrelierten wie folgt:

TABELLE 3

Tumorgröße	T1-mRNA-Spiegel		
	I	II	III
pT1 (15)	9 (60%)	5 (33%)	1 (7%)
pT2 (17)	2 (12%)	10 (59%)	5 (29%)
pT3/pT4 (9)	3 (33%)	5 (56%)	1 (11%)

3.4 T1-Expression und Nodalstatus

Zwischen T1-Expression und Nodalstatus wurden folgende Zusammenhänge beobachtet:

TABELLE 4

Nodalstatus	T1-mRNA-Spiegel		
	I	II	III
Nodal-negativ (22)	9 (41%)	10 (45%)	3 (14%)
Nodal-positiv (16)	5 (31%)	9 (56%)	2 (13%)

Beispiel 4

Prognostische Signifikanz der T1-mRNA-Expression

4.1 Prognostische Signifikanz für alle Patienten

Von 32 beobachteten Patienten überlebten den Beobachtungszeitraum von 47 Monaten 24 Patienten (75%). Innerhalb dieses Zeitraums traten Karzinome in 16 der beobachteten Patienten wieder auf (50%). Bei einer univariaten Analyse aller Patienten erlaubte die T1-Messung keine Vorhersage über Rezidiv oder Überleben. Die klassischen Prognosefaktoren Lymphknotenstatus und Tumogröße waren dagegen von hohem prognostischem Wert.

4.2 Prognostische Signifikanz der T1-mRNA-Expression in axillär Nodal-negativen Patienten

Die Nodal-negative Gruppe umfaßte 18 Patienten, von denen 7 (39%) ein erneutes Karzinom entwickelten. In der Nodal-negativen Patientengruppe war der Grad der T1-Expression ein starker prognostischer Indikator für ein Wiederauftreten der Erkrankung, vergleichbar dem bekannten Ki67-Marker, während sich

die Tumorgröße als prognostisch wertlos erwies. Keiner der 8 Nodal-negativen, T1-positiven Patienten entwickelte während des Beobachtungszeitraums eine erneut auftretende Erkrankung. In 2 zusätzlichen Patienten dieser Gruppe wurden bereits zum Zeitpunkt der Operation Knochenmetastasen diagnostiziert; beide überlebten während des Beobachtungszeitraums. Im Gegensatz dazu entwickelten 5 von 8 Nodal-negativen, T1-negativen Patienten (62,5%) ein erneutes Karzinom und 2 (25%) starben innerhalb des Beobachtungszeitraums (siehe Abbildung 3).

4.3 Prognostische Signifikanz der T1-mRNA-Expression in axillär Nodal-positiven Patienten

Die Nodal-positiven Patientengruppe umfaßte 14 Patienten, von denen 9 ein Karzinomrezidiv entwickelten. Von diesen waren nur 4 T1-negativ. In einem Patienten wurden zum Zeitpunkt der Operation Metastasen diagnostiziert. Die 3 Nodal-negativen Patienten ohne Metastasen blieben karzinomfrei. Von den 10 Nodal-positiven, T1-positiven Patienten entwickelten 8 (80%) ein erneutes Karzinom und 6 (60%) verstarben innerhalb des Beobachtungszeitraums.

Beispiel 5

Immunhistochemische Analyse von Mammakarzinomproben

5 µm dicke Gewebeschnitte von Formalin-fixierten, in Paraffin eingebettetem Gewebe wurden deparaffiniert und mit einem polyklonalen Antiserum gegen die carboxyterminale Sequenz von T1-S (Rössler, 1995a) inkubiert (8,5 µg IgG/ml). Die T1-spezifische Immunreaktion wurde mittels eines sekundären biotinylierten anti-Kaninchen-Antikörpers, eines Avidinperoxidasekomplexes und Diaminobenzidinfärbung nachgewiesen (Immunostaining Kit: Vectastain Elite ABC Kit, Vector Laboratories via SERVA, Heidelberg, FRG). T1-spezifische Färbung: braun, Gegenfärbung mit Hämatoxylin: blau. Die Analyse belegt die Anwesenheit

von T1-Protein in den Tumorzellen, nicht aber im umgebenden Stroma (Abbildung 4). Die Ergebnisse der immunhistochemischen Analyse entsprechen daher denen der in situ-Hybridisierung mit T1-spezifischen Sonden.

Beispiel 6

T1-S-mRNA-Spiegel und Progression des Krankheitsverlaufs von axillär Nodal-negativen Patienten

In einer späteren Studie wurde der Spiegel tumorassozierter T1-S-mRNA in Gewebe von 55 Patienten mit primärem invasivem Nodal-negativen Brustkrebs und 6 Fällen von FCD (fibrozystische Dysplasie ohne Atypien; eine benigne, fibrotische Veränderung der Brust) analysiert. Alle Patienten wurden zwischen 1989 und 1993 im Krankenhaus der technischen Universität München mastektomiert und für die Untersuchung ausgewählt, weil von ihnen frisch eingefrorenes Gewebe und klinikopathologische Daten zur Verfügung standen. Die klinischen Daten der Patienten sind in der folgenden Tabelle 5 zusammengefaßt.

TABELLE 5

Klinische Daten des Patientenkollektivs:

Parameter	Definition	N =	T1-RNA-Spiegel	
			niedrig	hoch
		(55)	(21)	(34)
Tumogröße	≤ 3 cm	33	13	20
	> 3 cm	22	8	14
Durchschnittliches Alter	Jahre	55	52	59
Östrogenrezeptor (ER)	ER-negativ ER-positiv	10 45	4 17	6 28
Progesteronrezeptor (PR)	PR-negativ PR-positiv	20 35	9 12	8 26
Tumorstadium p = 0,0224	G < 3 G3	34 21	9 12	25 9

Rezidive $p = 0,0220$	Rezidive keine Rezidive	10 45	7 14	3 31
tumorbedingte Todesfälle	verstorben am Leben*	6 49	3 18	3 31

* zum Zeitpunkt der Nachuntersuchung

Die T1-S-mRNA-Spiegel im Brustgewebe wurden in der Gesamt-RNA unter Verwendung des oben beschriebenen empfindlichen semiquantitativen RT-PCR-Tests bestimmt (siehe Material und Methoden, 3.3), mit dem der 3' nicht-translatierte Bereich der T1-S-mRNA nachgewiesen wird. Normalisierte T1-RNA-Spiegel wurden aus den tumorassoziierten T1-S-mRNA-Spiegeln berechnet und als niedrig (T1-Spiegel $\leq 0,1$) oder hoch (T1-Spiegel $\geq 0,1$) klassifiziert. Die 6 FCD-Fälle und 21 der 55 Brustkrebsfälle (38%) zeigten einen niedrigen T1-RNA-Spiegel. Von den 34 (62%) Tumoren mit hohem T1-RNA-Spiegel wiesen 26 (47%) mittlere Spiegel auf (T1-RNA-Spiegel $\leq 0,5$), während 8 (15%) Tumoren hohe Spiegel (T1-RNA-Spiegel $\geq 0,5$) T1-S-mRNA enthielten.

Die Korrelation des T1-RNA-Spiegels mit verschiedenen klinikopathologischen Parametern wurde in einer univariaten Analyse untersucht; die Ergebnisse sind in Tabelle 5 zusammengefaßt. Der T1-RNA-Spiegel zeigte keinen Zusammenhang mit dem Patientenalter, dem histologischen Tumortyp, der Tumorgröße oder der Expression von Östrogen- und/oder Progesteronrezeptoren. Der T1-RNA-Spiegel war jedoch signifikant assoziiert mit der Tumordifferenzierung ($p=0,022$): 25 von 34 (70%) der Tumore mit hohem T1-RNA-Spiegel, aber nur 9 von 21 (43%) der Tumore mit niedrigem T1-RNA-Spiegel waren gut oder mäßig differenziert (G1, G2). Weiterhin war der T1-RNA-Spiegel signifikant mit dem erkrankungsfreien Überleben der Patienten innerhalb eines mittleren Beobachtungszeitraums von 5 Jahren (37 bis 93 Monate) assoziiert: 10 von 55 Patienten (18%) entwickelten wiederum eine Erkrankung. Es traten Rezidive in 7 von 21 (33%) Tumoren mit niedrigem T1-RNA-Spiegel, aber nur in 3 von 34 (9%) Tumoren mit hohem T1-RNA-Spiegel auf. 91% der Fälle mit hohem T1-RNA-Spiegel

blieben krankheitsfrei. Diese Gruppe mit einer ausgezeichneten Prognose umfaßte alle 8 Patienten mit dem höchsten T1-RNA-Spiegel ($\geq 0,5$). Infolge der niedrigen Anzahl an Patienten war diese Feststellung statistisch nicht signifikant. Das Risiko für ein späteres Wiederauftreten der Krankheit war in Tumoren mit hohem T1-RNA-Spiegel 3,7-fach geringer im Vergleich mit Tumoren mit niedrigem T1-RNA-Spiegel ($p=0,022$). Kaplan-Meyer-Kurven für das erkrankungsfreie Überleben der Patienten mit hohem versus niedrigem tumorassoziierten T1-RNA-Spiegel zeigten einen signifikanten Unterschied innerhalb eines 17 Monate währenden Beobachtungszeitraums (Abb. 5).

Beispiel 7

Immunhistologischer Nachweis von T1-Protein in Brustkrebsgewebe

Für 31 der in Beispiel 6 mittels RT-PCR analysierten Brustkarzinome stand formalinfixiertes, in Paraffin eingebettetes Gewebe für die immunhistochemische Analyse der T1-Expression zur Verfügung. Bei den hierbei zur Bestimmung des Ortes der T1-Proteinsynthese und der Ablagerung in Tumorgewebe verwendeten Antiseren handelte es sich (1) um einen monoklonalen Antikörper, der gegen humanes rekombinates T1-S-Protein erzeugt worden war, und (2) ein polyklonales Antiserum, das spezifisch mit murinem T1-S-, aber nicht mit T1-M-Protein reagiert (Anti-c-Peptid; Rössler et al., 1995a). Die immunhistochemischen Versuche wurden mit beiden Antikörpern durchgeführt; beide Antikörper führten zu ähnlichen Ergebnissen.

Gewebeschnitte von normalem Brustgewebe und FCD-Gewebe zeigte eine leichte T1-Reaktivität in den duktalen epithelialen Zellen. Von den 31 analysierten primären Brustkarzinomen wiesen 30 eine T1-Reaktivität in den Tumorzellen, wenn auch in sehr unterschiedlichem Ausmaß, auf. Die Intensität der T1-Reaktivität unterschied sich drastisch zwischen individuellen Zellen innerhalb eines Tumorzell-Clusters und in der Fraktion der T1-reaktiven Tumorzellen in Gewebe aus unterschiedlichen Patienten (10% bis $> 90\%$). In duktalen Karzinomen wie-

sen Tumorzellen, die in festen oder tubulären Bezirken wuchsen, sehr häufig eine höhere T1-Reaktivität auf als disseminierte, einzelne Tumorzellen. 6 von 10 Tumoren, die ein hohes Maß an T1-Reaktivität in den Tumorzellen zeigten, zeigten auch eine signifikante T1-Reaktivität im Stroma. Alle 5 lobulären und 2 medullären Karzinome zeigten eine niedrige bis mittlere T1-Reaktivität der Tumorzellen. Ein Tumor zeigte keinerlei immunhistochemisch nachweisbare T1-Reaktivität, während er mit anderen Antiseren, z.B. zum Nachweis von Östrogen- und Progesteronrezeptoren, reagierte.

Beispiel 8

Immunhistochemische Bestimmung des T1-Proteinspiegels

Die immunhistochemische T1-Reaktivität wurde mittels einer Modifikation des Protokolls von Remmele und Stegener, 1987, bestimmt, wobei die Fraktion der T1-reaktiven Tumorzellen und ihre Färbungsintensität als Parameter dienten (siehe Material und Methoden, 4.2). Die resultierende Klassifizierung (T1-Proteinspiegel) überspannt einen Bereich von 0 (keine T1-Reaktivität) bis 12 (hohe T1-Reaktivität in $\geq 80\%$ der Tumorzellen).

11 der 21 Karzinome mit niedrigem T1-RNA-Spiegel wurden immunhistochemisch untersucht und zeigten eine niedrige T1-Reaktivität mit einem mittleren T1-Proteinspiegel von 2,9 (Bereich: 0 bis 6). Von den 34 Tumoren mit hohem T1-RNA-Spiegel wurden 20 immunhistochemisch untersucht. 19 von 20 zeigten eine T1-Reaktivität mit einem mittleren T1-Proteinspiegel von 7,6 (Bereich: 2 bis 12). Ein Tumor wies keinerlei immunhistochemisch nachweisbare T1-Reaktivität auf (T1-RNA-Spiegel = 0,21).

Beispiel 9

Vergleich der Ergebnisse aus RT-PCR und immunhistochemischer Untersuchung

Bei der in Beispiel 6 beschriebenen Untersuchung beruhte die Analyse der Expression der tumorassoziierten T1-S-Spiegel auf dem empfindlichen Nachweis von T1-S-mRNA mittels RT-PCR. Es wurde erwartet, daß die T1-S-mRNA-Spiegel die T1-S-Proteinsynthese reflektieren, da die ausführliche Untersuchung von Maus-T1 keinerlei Hinweis auf posttranskriptionale Regulation der T1-Genexpression gab. Diese Annahme bestätigte sich beim Vergleich der mit RT-PCR und nach immunhistochemischem Nachweis von T1-Protein erhaltenen Ergebnisse für 31 Tumore. Nur zwei der Tumore führten zu inkonsistenten Ergebnissen beim Vergleich der beiden Methoden, die auf einen posttranskriptionalen oder translationalen Regulationsmechanismus hinweisen könnten: Ein Tumor zeigte hohe T1-S-mRNA-Spiegel, aber keine T1-Reaktivität. Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz wäre ein Block der T1-Translation. Der andere Tumor zeigte niedrige T1-S-mRNA-Spiegel und eine hohe zelluläre T1-Reaktivität. Diese Diskrepanz könnte entweder auf einer gesteigerten Translationsaktivität oder einer intrazellulären Akkumulation des T1-Genproduktes in Folge eines Sekretionsdefektes der Zellen beruhen.

Die Konsistenz der T1-Expressionsspiegel nach Bestimmung mit zwei unabhängigen Verfahren bestätigt die Anwendbarkeit des hierin verwendeten Ansatzes.

Beispiel 10

Prognostischer Wert der T1-RNA-Bestimmung in Nodal-negativen Patienten

Die klassischen prognostischen Faktoren Tumogröße und Hormonrezeptorstatus waren in der Gruppe Nodal-negativer Patienten, die gemäß den Beispielen 6 bis 9 untersucht worden sind und die durch einen hohen Anteil kleiner (≤ 3 cm) und schlecht differenzierter (G3) Tumoren mit einem positiven Status für Östrogen- und Progesteronrezeptoren gekennzeichnet waren, nicht von prognostischem Wert. Der einzige andere Faktor, der für die Prognose der Patienten Signifikanz hat, ist das Tumor- "Grading" ($p=0,001$), das den besten prognostischen Indikator für dieses Kollektiv darstellte. 9 von 10 Rezidiven traten in den

21 schlecht differenzierten (G3) Tumoren auf (43%). Obwohl angesichts der begrenzten Anzahl von Patienten eine multivariate Analyse nicht durchgeführt worden ist, weisen die Daten der Erfinder darauf hin, daß der T1-RNA-Spiegel ein weiterer nützlicher Marker zur Identifizierung von Patienten mit G3-Tumoren ist, die ein erhöhtes Risiko für Rezidive haben. Um diesen Effekt zu demonstrieren, wurden Patienten mit G3-Tumoren zunächst entsprechend ihrem T1-RNA-Spiegel eingeteilt. Die resultierende Gruppe von 12 G3-Fällen mit niedrigem T1-RNA-Spiegel hatte ein drastisch erhöhtes Risiko für ein erneutes Auftreten der Erkrankung (6 Rezidive, 50 %) im Vergleich mit den 9 G3-Fällen mit hohem T1-RNA-Spiegel (2 Rezidive, 22%). Eine statistisch signifikante Auf trennung ($p=0,029$) dieser G3-Untergruppen wurde mit dem korrigierten T1-Spiegel erhalten: bei 7 von 12 G3-Fällen mit niedrigem T1-Spiegel (58%), aber nur bei einem von 9 Fällen mit hohem T1-Spiegel (11%) wurde innerhalb des Beobachtungszeitraums ein erneutes Karzinom beobachtet.

Die obigen Ergebnisse zeigen, daß der T1-Spiegel, entweder allein oder in Kombination mit dem Tumor-Grading, einen vielversprechenden neuen prognostischen Indikator darstellt, um Patienten mit Nodal-negativem Brustkrebs zu identifizieren, die ein stark erhöhtes Risiko für ein erneutes Auftreten der Erkrankung haben. Die frühe Identifizierung und eine selektive begleitende Therapie dieser Hochrisikopatienten kann eine vielversprechende Strategie zur Verbesserung der individuellen Prognose darstellen. Gegenwärtige Bemühungen konzentrieren sich auf die Etablierung vereinfachter Verfahren für die Bewertung der tumorassoziierten T1-S-Expression. Wie in den Beispielen 8 und 9 gezeigt werden ist, ist die Immunhistochemie an formalinfixiertem, in Paraffin eingebettetem Gewebe eine erfolgversprechende Alternative zur RNA-Analyse. Gegenwärtig wird die prognostische Signifikanz von immunhistochemisch nachgewiesenen tumorassoziierten T1 in einem größeren Patientenkollektiv untersucht.

Literaturliste

Allred, D.C., et.al., 1992, Human Pathol. 23, 974-979.

Archer, S.G., et.al., 1995, Br. J. Cancer. 72, 1259-1266.

Auer, G., et.al., 1994, Cancer Res. 44, 394-396.

Barnes, D.M., et.al., 1993, Human Pathol. 24, 469-476.

Danescu, J., und Werenskiold, A.K. 1995, FEBS Lett. 367, 89-92.

Domagala, W., et.al., 1990, Am. J. Pathol. 137, 1059-1064.

Gayle, J. et al., 1996, J. Biol. Chem. 271, 5784-5789.

Graff, J.R., et.al., 1995, Cancer Res. 55, 5195-5199.

Hoskins, K., und Weber, B.L., 1995, Curr. Opin. Oncol. 7, 495-499.

Jaenicke, F., et.al., 1993, Breast Cancer Res. Treatment. 24, 195-208.

Kievits, T., et al., 1991, J. Virol. Methods 35, 273-286.

Klemenz, R., et.al., 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 5708-5712.

Lipponen, P., et.al., 1993, Int. J. Cancer. 55, 51-56.

Maniatis, T. et al., 1982, Molecular Cloning: A Laboratory Manual; Cold Spring Harbor, N.Y.

McMaster et al., 1977, G.K., und G.G. Carmichael, PNAS 74, 4835-4838, 1977.

Pachl, C., et al., 1994, J. AIDS ?, ?

Rasbridge, S. A., et.al., 1993, J. Pathol. 169, 245-250.

Remmele und Stegener, 1987, Frauenarzt 2, 41-43.

Rößler, U., et.al., 1993, Oncogene 8, 609-617.

Rößler, U., et.al., 1995a, Dev. Biol. 168, 86-97.

Rößler, U., et.al., 1995b, E. J. Pathol. 1, file 952-03.

Rupp, B., et al., 1995, Biochem. Biophys. Res. Com. 216, 595-601.

Schmitt, M., Graff, H., and Kindermann, G. (1994) Elsevier, Amsterdam.

Sommers, C.L., et.al., 1992, Cancer Res. 52, 5190-5197.

Thomassen, E., et.al., Cell Growth Differ. 6, 178-184.

Thompson, E.W., et.al., 1991, J. Cell. Physiol. 150, 534-544.

Tominaga, S., et al., 1992, Biochem. Biophys. Acta 1171, 215-218.

Walker, G.T., et al., 1996, Nucleic Acids Research 24, 348-353.

Werenskiold, A.K., 1992, Eur. J. Biochem. 204, 1041-1047.

Werenskiold, A.K., et.al., 1989, Mol. Cell. Biol. 9, 5207-5214.

Wilhelm, O., et.al., In: Prospects in diagnosis and treatment of breast cancer.
Elsevier, Excerpta Medica, 145-156.

Yuan, J., et.al., 1992, Br. J. Cancer 65, 461-465.

Patentansprüche

1. In vitro-Verfahren zum Prognostizieren des Krankheitsverlaufs von Patienten mit Mammakarzinom und/oder zum Diagnostizieren eines Mammakarzinoms, umfassend das qualitative oder quantitative Bestimmen von T1-Protein und/oder T1-mRNA in aus dem Patienten gewonnenem Probenmaterial.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß T1-Protein und/oder T1-mRNA einer Tumorgewebeprobe des Patienten bestimmt wird.
3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß T1-Protein in einer Blut- oder Serumprobe bestimmt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß T1-mRNA mit einem auf PCR beruhenden Verfahren bestimmt wird.
5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Probenmaterial einem für T1 spezifischen Antikörper oder Fragmenten davon ausgesetzt wird und T1-Protein qualitativ oder quantitativ bestimmt wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein monoklonaler oder polyklonaler Antikörper ist.
7. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper gegen das p9-Peptid gerichtet ist.
8. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper gegen das p16-Peptid gerichtet ist.

9. Kit, dadurch gekennzeichnet, daß er zum Durchführen eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 3 und 5 bis 8 geeignet ist und einen T1-spezifischen Antikörper oder Fragmente enthält.
10. Kit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der T1-spezifische Antikörper ein monoklonaler Antikörper ist.
11. Kit nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß der T1-spezifische Antikörper ein polyklonaler Antikörper ist.
12. Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der T1-spezifische Antikörper gegen das p9-Protein gerichtet ist.
13. Kit nach einem der Ansprüche 9 bis 11, dadurch gekennzeichnet, daß der T1-spezifische Antikörper gegen das p16-Protein gerichtet ist.
14. Kit, dadurch gekennzeichnet, daß er zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 1 bis 4 geeignet ist und mindestens ein Oligonukleotid enthält, das zur T1-mRNA komplementär ist, sowie gegebenenfalls ein oder mehrere weitere Oligonukleotide, die die Amplifikation von T1-spezifischer mRNA und/oder eines dazu komplementären Stranges erlauben.
15. Kit nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß er weiterhin RNase H und reverse Transkriptase enthält.
16. Kit nach einem der Ansprüche 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, daß das zur T1-mRNA komplementäre Oligonukleotid die Sequenz 5'-CTT TGA TCA CCT GAA CTT TCT CTA GCA-3' aufweist.

17. Kit nach einem der Ansprüche 14 bis 16, dadurch gekennzeichnet, daß das weitere Oligonukleotid die Sequenz 5'-AGT TTT CGG TTG TTG GTG CAT TTC-3' als weiterem Oligonukleotid vor. In bevorzugten Ausführungsformen aufweist.
18. Verwendung eines T1-spezifischen Antikörpers oder von Fragmenten davon zum Nachweisen der Gegenwart von T1-Protein in Gewebeproben, Blut- oder Serumproben eines Patienten mit Mammakarzinom.
19. Verwendung eines T1-spezifischen Oligonukleotids zum Nachweisen von T1-mRNA in Gewebeproben, Blut- oder Serumproben eines Patienten mit Mammakarzinom.
20. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß das T1-spezifische Oligonukleotid zur T1-mRNA komplementär ist.
21. Verwendung nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß die Sequenz des T1-spezifischen Oligonukleotids einem Teil der Sequenz der T1-mRNA entspricht.
22. Verwendung nach einem der Ansprüche 19 bis 21, dadurch gekennzeichnet, daß die T1-mRNA ganz oder teilweise amplifiziert wird.

Abb. 1: Nachweis humaner T1-mRNA-Spezies

Fig.1 A

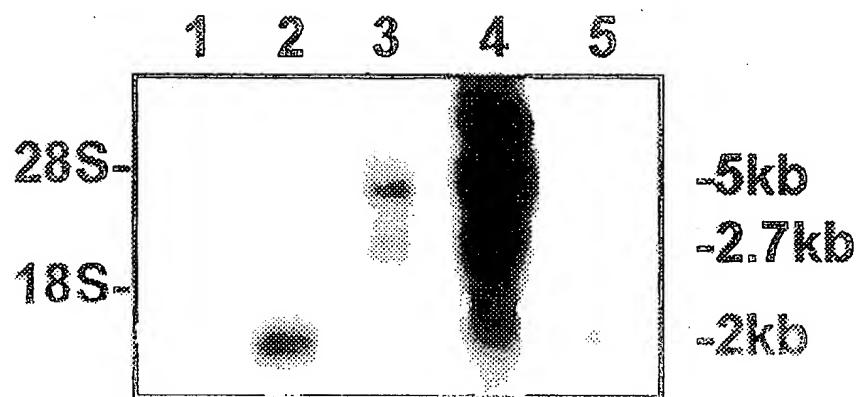


Fig.1B



BEST AVAILABLE COPY

Abb. 1: Nachweis humaner T1-mRNA-Spezies

Fig. 1C

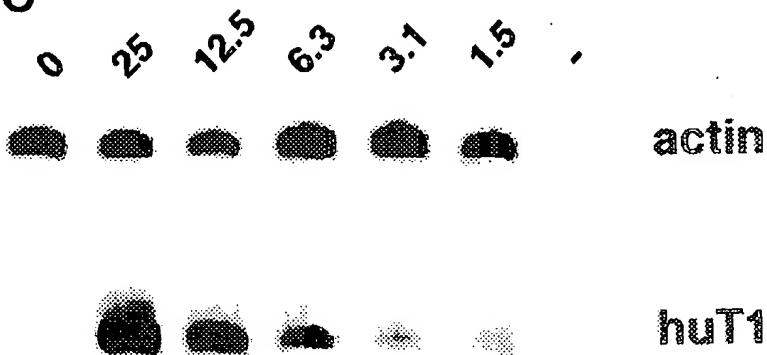
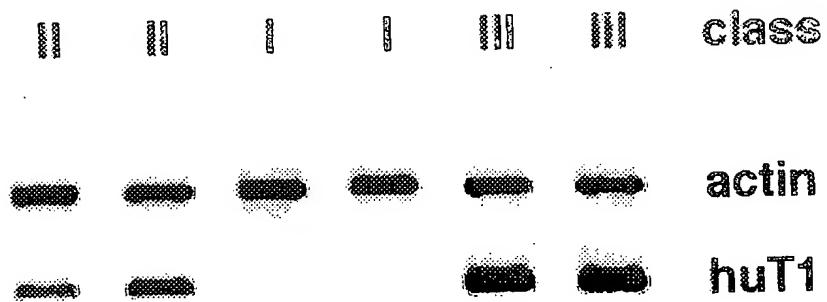


Abb. 2: Nachweis von 2,7 kb-T1-mRNA in humanen Brusttumoren

Fig. 2



BEST AVAILABLE COPY

Abb. 3

Metastasierung in Nodal-negativen Patientinnen

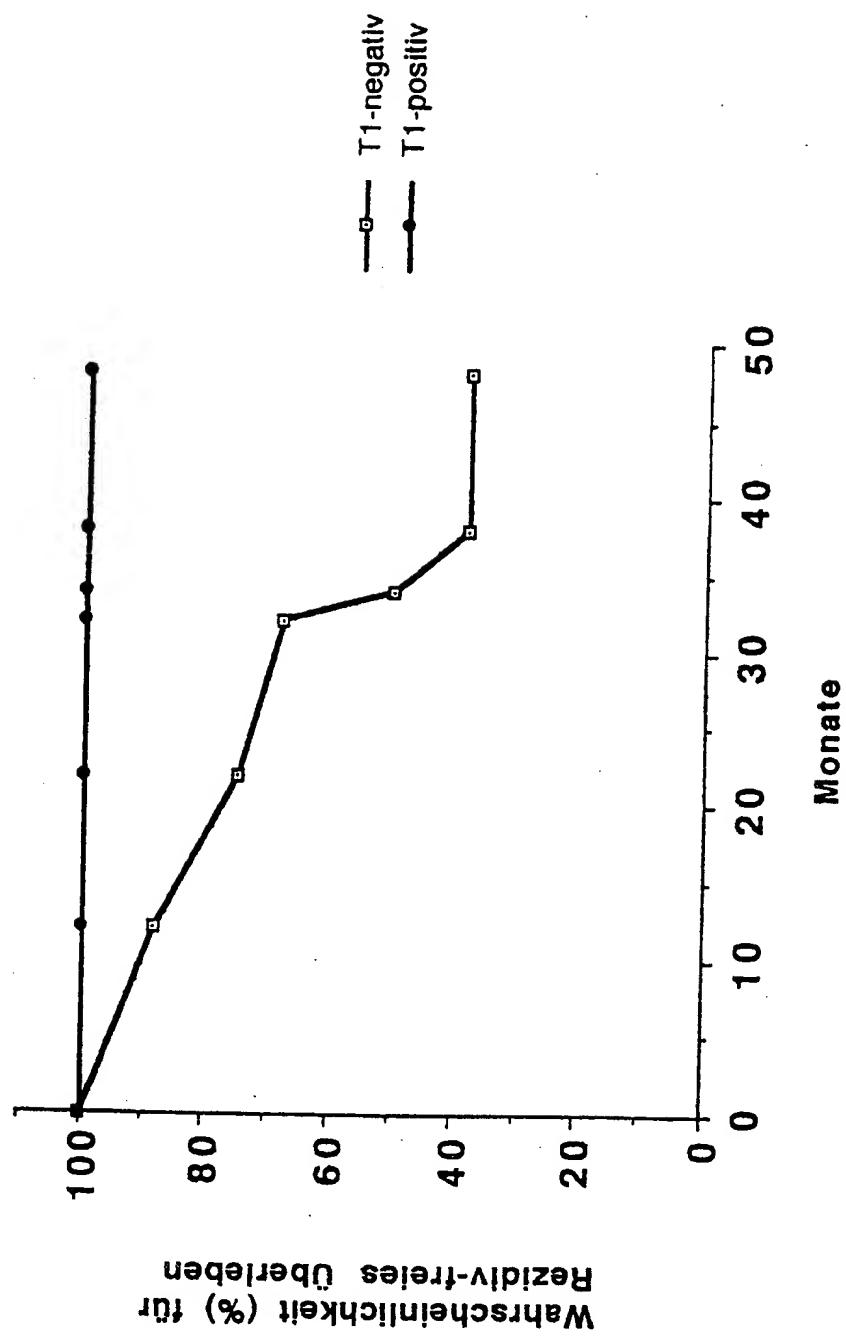
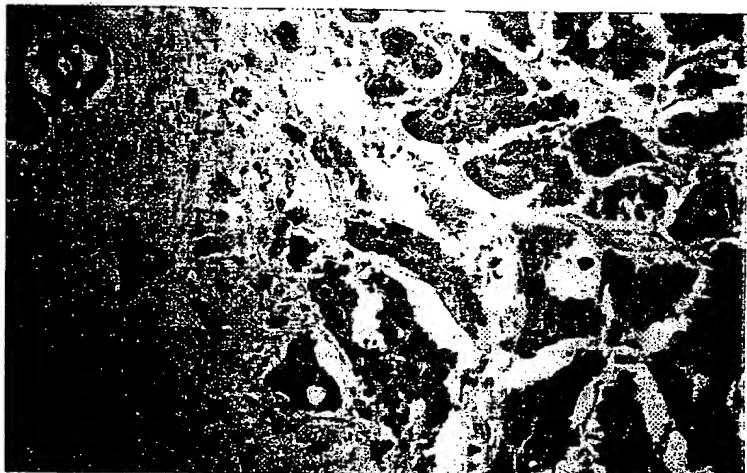
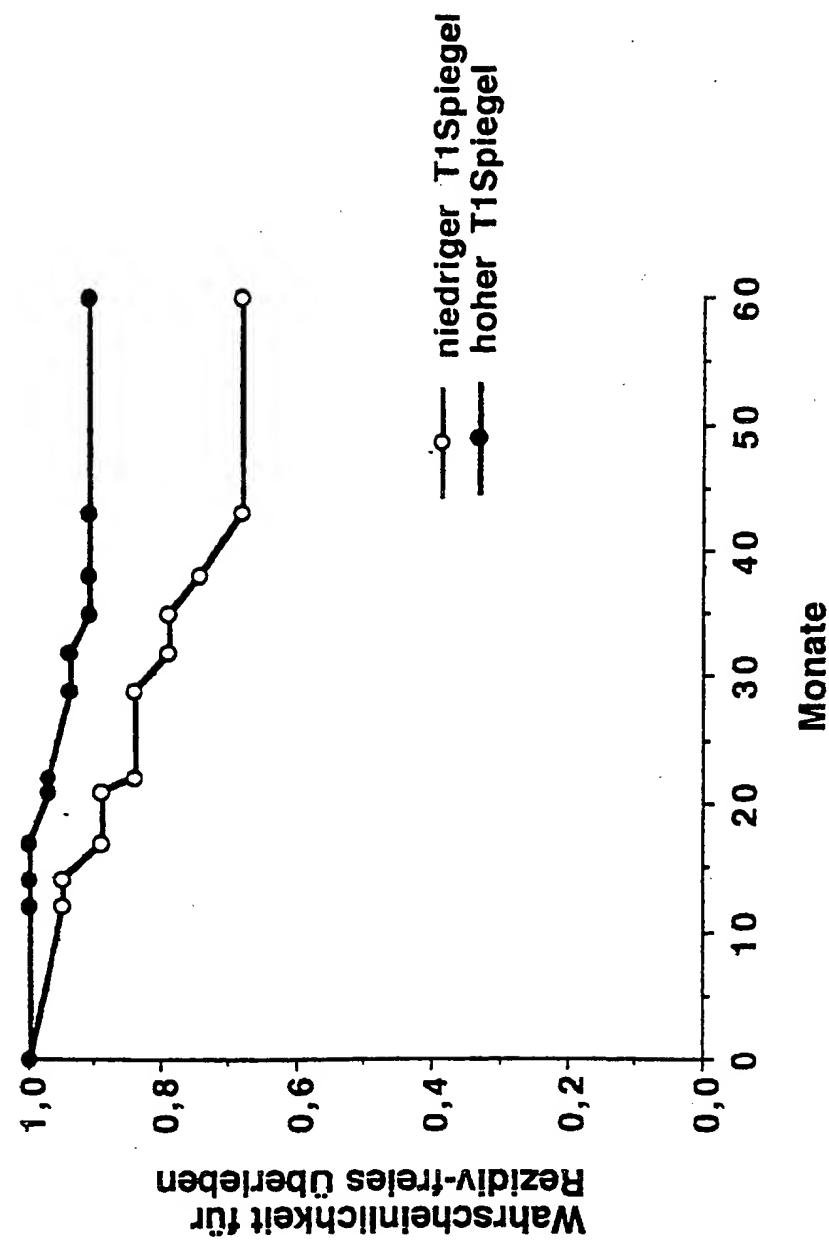


Abb. 4



BEST AVAILABLE COPY

Abb. 5





(51) Internationale Patentklassifikation 6 : G01N 33/574, 33/577		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 98/43090 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 1. Oktober 1998 (01.10.98)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP98/01627 (22) Internationales Anmeldedatum: 20. März 1998 (20.03.98) (30) Prioritätsdaten: 197 11 932.8 21. März 1997 (21.03.97) DE		(81) Bestimmungsstaaten: CA, JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> (88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 11. November 1999 (11.11.99)	
(71)(72) Anmelder und Erfinder: WERENSKIOLD, Anne, Katrin [DE/DE]; Reulandstrasse 32, D-81377 München (DE). (74) Anwalt: GRÜNECKER, KINKELDEY, STOCKMAIR & SCHWANHÄUSSER; Maximilianstrasse 58, D-80538 München (DE).			
<p>(54) Title: <i>IN VITRO METHOD FOR PROGNOSIS OF CARCINOMA OF THE BREAST</i></p> <p>(54) Bezeichnung: <i>IN VITRO-VERFAHREN ZUM PROGNOSTIZIEREN DES MAMMAKARZINOMS</i></p> <p>(57) Abstract Especially nodal conditions and tumour size, histological type, degree of differentiation and receptor condition are used nowadays for the prognosis and further planning of patients with carcinoma of the breast. Emphasis is placed on evaluation of the condition of the axillary lymph node. Patients with a negative axillary lymph node condition generally receive no after-treatment, as their prognosis is better; yet 30 % of these patients suffer relapses. The method proposed by this invention should make it possible to determine the patient's risk of recidivation. In accordance with the invention, the invention makes it possible to predict the further evolution of patients with carcinoma of the breast by means of a qualitative or quantitative determination of T1 protein and/or T1-mRNA in sample material taken from the patients.</p> <p>(57) Zusammenfassung Für die Prognose und weitere Therapieplanung von Mammakarzinompatienten werden heute in erster Linie der Nodalstatus sowie die Tumogröße, der histologische Typ, der Differenzierungsgrad und der Rezeptorstatus herangezogen, wobei der Schwerpunkt auf der Beurteilung des axillären Lymphknotenstatus liegt. Patienten mit negativem axillären Lymphknotenstatus werden, da sie eine bessere Prognose haben, in der Regel nicht nachbehandelt; 30 % dieser Patienten entwickeln jedoch Rezidive. Das Verfahren soll es ermöglichen, die Rezidivgefährdung von Patienten festzustellen. Das erfundungsgemäße Verfahren erlaubt durch die qualitative oder quantitative Bestimmung von T1-Protein und/oder T1-mRNA in aus dem Patienten gewonnenem Probenmaterial eine Vorhersage des weiteren Krankheitsverlaufs von Patienten mit Mammakarzinom.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidschan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauritanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/01627

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 6 G01N33/574 G01N33/577

According to International Patent Classification(IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 19, 10 May 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 188980, XP002076167 cited in the application see abstract & U. ROESSLER ET AL.: "T1, an immunoglobulin superfamily member, is expressed in H-ras-dependent epithelial tumors of mammary cells" ONCOGENE, vol. 8, no. 3, 1993, pages 609-617, Bethesda MD USA</p> <p>---</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-22



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 September 1998

Date of mailing of the international search report

11/09/1998

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Van Bohemen, C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 98/01627

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 17, 27 April 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 171919, XP002076168 cited in the application see abstract & A.K. WERENSKIOLD: "Characterization of a secreted glycoprotein of the immunoglobulin superfamily inducible by mitogen and oncogene. " EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, vol. 204, no. 3, 1992, pages 1041-1047, ---</p>	1-22
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 17, 23 April 1990 Columbus, Ohio, US; abstract no. 152789, XP002076169 cited in the application see abstract & R. KLEMENZ ET AL.: "Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, vol. 86, no. 15, 1989, pages 5708-5712, Bethesda MD USA ---</p>	1-22
T	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 98, Philadelphia, PA, US; abstract no. 107727, XP002076166 see abstract & A.K. WERENSKIOLD ET AL.: "T1 protein. A novel tumor marker in no-breast carcinoma? " TUMOR BIOLOGY, vol. 18, no. suppl. 2, 19 September 1997, page 38 Montreux Ch -----</p>	1-22

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01627

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 GO1N33/574 GO1N33/577

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 GO1N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ³	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 118, no. 19, 10. Mai 1993 Columbus, Ohio, US; abstract no. 188980, XP002076167 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung & U. ROESSLER ET AL.: "T1, an immunoglobulin superfamily member, is expressed in H-ras-dependent epithelial tumors of mammary cells" ONCOGENE, Bd. 8, Nr. 3, 1993, Seiten 609-617, Bethesda MD USA ----</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-22



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

<p>³ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen : "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist "E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt) "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p>	<p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>
---	---

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absendedatum des internationalen Recherchenberichts
1. September 1998	11/09/1998
Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Van Bohemen, C

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Ir nationales Aktenzeichen

PCT/EP 98/01627

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 116, no. 17, 27. April 1992 Columbus, Ohio, US; abstract no. 171919, XP002076168 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung & A.K. WERENSKIOLD: "Characterization of a secreted glycoprotein of the immunoglobulin superfamily inducible by mitogen and oncogene." EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, Bd. 204, Nr. 3, 1992, Seiten 1041-1047, ---</p>	1-22
A	<p>CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 112, no. 17, 23. April 1990 Columbus, Ohio, US; abstract no. 152789, XP002076169 in der Anmeldung erwähnt siehe Zusammenfassung & R. KLEMENZ ET AL.: "Serum- and oncoprotein-mediated induction of a gene with sequence similarity to the gene encoding carcinoembryonic antigen." PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE USA, Bd. 86, Nr. 15, 1989, Seiten 5708-5712, Bethesda MD USA ---</p>	1-22
T	<p>BIOLOGICAL ABSTRACTS, vol. 98, Philadelphia, PA, US; abstract no. 107727, XP002076166 siehe Zusammenfassung & A.K. WERENSKIOLD ET AL.: "T1 protein. A novel tumor marker in no-breast carcinoma?" TUMOR BIOLOGY, Bd. 18, Nr. suppl. 2, 19. September 1997, Seite 38 Montreux Ch -----</p>	1-22